

2. Абрамова И. В. Сезонная динамика населения птиц полей // Актуальные проблемы экологии : материалы I Междунар. науч. конф. : в 2 ч. (Гродно, 6–8 окт. 2004 г.). Гродно, 2005. Ч. 1. С. 157–160.
3. Кусенков А. Н. Птицы сельскохозяйственных угодий юго-востока Белоруссии // Чтения памяти проф. В. В. Станчинского. Смоленск, 1995. № 2. С. 41–46.
4. Самусев А. Д. Размещение пернатой дичи в злаковых культурах на осушенных землях восточной части Белорусского Полесья и методы сохранения дичи в период уборки этих культур // Животный мир Белорусского Полесья, охрана и рациональное использование : тез. докл. 3-й обл. науч. конф. (Гомель, октябрь 1983 г.). Гомель, 1983. С. 43–44.
5. Сербун А. А., Гайдук В. Е. К мониторингу обычных гнездящихся видов птиц в агроландшафтах юго-запада Беларуси // Весн. Брэсц. ун-та. Сер. 5, Хімія. Біялогія. Навукі аб зямлі. 2010. № 2. С. 63–69.
6. Jarvinen O., Vaisanen R. A. Line transect method: a standard for field-work // Polish Ecol. Stud. 1977. Vol. 3, № 4. P. 11–15.
7. Кузьменко Т. М. Орнітофауністична класифікація полів сільськогосподарських культур : тез. доп. конф. молодих дослід. зоологів (Київ, 18–19 квітня 2012 р.) // Зоологічний кур'єр. 2012. № 6. С. 17–18.
8. Anderson B. W., Ohmart R. D., Rice J. Avian and vegetation community structure and hear seasonal relationship in the lower Colorado River Valley // Condor. 1983. № 4. P. 392–405.
9. Бутьев В. Т., Ежова С. А. Структура населения птиц сельскохозяйственных угодий в условиях тайги Европейской территории СССР // Морфология, систематика и экология животных : межвуз. сб. науч. тр. М., 1988. С. 28–38.

Поступила в редакцию 25.06.2014.

Александр Александрович Сербун – аспирант кафедры экологии и методики преподавания биологии. Научный руководитель – доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой экологии и методики преподавания биологии В. В. Гричик.

УДК 577.212.3:595.753

В. И. ГОЛОВЕНЧИК, Н. В. ВОРОНОВА, С. В. БУГА

ВНУТРИВИДОВАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ АЛЬФА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ 1 (EF1a) У ТЛЕЙ (HEMIPTERA: STERNORRHYNCHA: ARHIDOIDEA)

Корректная видовая диагностика насекомых-фитофагов является важнейшим условием контроля энтомофитосанитарного состояния фитоценозов. Определение видов по маркерным последовательностям ДНК представляет собой перспективное направление современной таксономии, позволяя идентифицировать близкие, морфологически сходные виды. Одним из таких маркеров потенциально может служить ядерный ген EF1a. Предварительно, однако, важно установить уровень внутривидовой изменчивости EF1a в целевой группе животных, поскольку большое число внутривидовых вариантов нуклеотидной последовательности маркера может полностью обесценить его в качестве диагностического инструмента.

В результате анализа 88 последовательностей гена EF1a у 28 видов тлей из 5 семейств было установлено, что общая внутривидовая вариабельность как нуклеотидной, так и аминокислотной последовательности EF1a у тлей является незначительной. Нуклеотидные последовательности отдельных участков гена EF1a обладали высоким (до 100 %) сходством. Большинство выявленных одонуклеотидных замен локализовались в экзонах, в то время как интроны, напротив, демонстрировали низкую нуклеотидную вариабельность. Доля выявленных несинонимичных нуклеотидных замен была нетипично высокой для эволюционно консервативных генов. Тем не менее общий уровень внутривидовой вариабельности EF1a позволяет рекомендовать этот ген как молекулярно-генетический маркер видовой диагностики тлей.

Ключевые слова: EF1a; тли; идентификация видов; молекулярные маркеры.

Nowadays EF1a karyogene is using as a phylogenetic marker. However, is very important to establish the level of the intraspecific variability of the gene, for using it also as a specific diagnostic marker, because a lot of intraspecific variants of the nucleotide sequence of the marker can fully depreciate it as a diagnostic tool.

As a result of the analysis of the 88 sequences of the gene EF1a of the 28 species of the aphids from the 5 families, it has been found that the general intraspecific variability of the both nucleotide and amino acid sequences EF1a of the aphids is not high. The nucleotide sequences of the separated areas of the EF1a gene have had a high affinity (over 100 per cent). The most of the identified single nucleotide substitutions have localised in the exons, while the introns, opposite, demonstrated the low frequency of the replacement. The win of the identified non-synonymous nucleotide substitutions was atypically high for the evolutionary conserved gene. Nevertheless, the general level of the intraspecific variability EF1a allows us to recommend it as a molecular genetic marker of the species diagnosis of the aphids.

Key words: EF1a; aphids; species identification; molecular markers.

Молекулярная филогенетика – это одно из современных направлений биологии, позволяющее проводить сравнительный анализ нуклеотидного состава ДНК и аминокислотного состава белков и на основании полученных данных делать заключения о родственных связях между различными группами живых организмов. Использование методов молекулярной филогенетики позволяет решать как фундаментальные вопросы, например построение дерева жизни и установление таксономической принадлежности различных биологических объектов, так и ряд прикладных проблем, в частности создание определительных систем для идентификации видов животных, микроорганизмов, растений и вирусов.

Методы молекулярно-генетической идентификации видов тлей применяют все более широко, поскольку эта группа насекомых включает большое количество труднодифференцируемых видов и видов-двойников, сложно идентифицируемых по морфологическим признакам [1, 2]. С этой целью используют так называемые молекулярно-генетические маркеры, которые представляют собой различные по консервативности области генома. Это кодирующие и некодирующие участки генов, межгенные спейсеры или сателлитные повторы разной длины, для которых на основании эмпирических данных было рассчитано, что скорость нуклеотидной эволюции по данным областям пропорциональна скорости эволюции таксонов.

В настоящее время в качестве маркеров для идентификации различных видов животных и в том числе тлей наиболее часто используют митохондриальные гены [3]. Однако в последнее время были получены многочисленные данные, показывающие, что маркеры митохондриального происхождения не всегда эффективны, что в разных группах животных обусловлено разными, иногда противоположными причинами. В некоторых группах насекомых общая высокая скорость нуклеотидных замещений в митохондриальном геноме приводит к появлению большого числа внутривидовых гаплотипов. У других (у тлей, в частности), напротив, высокая консервативность нуклеотидной последовательности митохондриальных генов становится причиной того, что близкие виды могут различаться единичной нуклеотидной заменой. Это, в свою очередь, не позволяет задействовать какие-либо другие подходы, доступные молекулярной генетике, кроме высокоточного секвенирования ДНК. В связи с этим возникла необходимость предложения новых маркеров для видовой диагностики тлей, прежде всего имеющих ядерную локализацию.

В качестве маркера с ядерным происхождением в филогенетике насекомых в последние годы широко используется ген EF1a. Это ген, кодирующий субъединицу одного из ключевых белков, участвующих в процессе синтеза полипептидов на рибосомах, что делает его достаточно консервативным, как это типично для большинства генов домашнего хозяйства. Ранее нами было показано [4], что ген EF1a у тлей обладает чрезвычайно консервативной интрон-экзонной структурой, при этом экзоны не варьируют по длине и мало варьируют по нуклеотидному составу. Эти особенности делают ген EF1a ценным филогенетическим маркером при работе с тлями. Однако для применения этого гена в качестве маркера видовой диагностики чрезвычайно важно установить уровень его внутривидовой изменчивости, поскольку большое число внутривидовых вариантов нуклеотидной последовательности маркера может полностью обесценить его как диагностический инструмент.

Изучение внутривидовой вариативности молекулярного маркера наибольшее значение имеет для тех групп животных, для которых характерно существование внутривидовых форм или генетически изолированных рас. Такие формы способны накапливать генетические различия внутри локальных или экологически специализированных популяций, асексуальных (партеногенетических) линий, что приводит к появлению так называемого мутационного шума, т. е. формированию различий, вносящих ошибки как в молекулярно-видовую диагностику, так и в филогенетические построения.

В настоящее время в литературе отсутствуют данные, характеризующие степень внутривидовой вариативности гена EF1a у тлей. В связи с этим целью нашей работы было изучение внутривидовой вариативности нуклеотидной последовательности гена EF1a и аминокислотной последовательности кодируемого им белка у этих насекомых, с тем чтобы оценить применимость EF1a как молекулярно-генетического маркера для видовой диагностики труднодифференцируемых видов и форм более низкого таксономического ранга у фитофагов.

Материал и методика исследований

Для изучения внутривидовой вариативности последовательности гена EF1a нами были использованы 88 последовательностей 28 видов тлей, принадлежащих к пяти различным семействам Aphidoidea (*Acyrtosiphon pisum* Harris, 1776: AY 219737.1, EU 071358.1; *Aphis craccivora* Koch, 1854: DQ 493842.1, EU 358905.1, EF 419316.1; *A. epilobiaria* Theobald, 1927: DQ 418854-55.1; *A. fabae* spp. Scopoli, 1763: AY 219724.1, EU 358908.1, JQ 860295-96.1; *A. farinosa* Gmelin, 1790: AY 219726.1, EU 358909.1; *A. gossypii* Glover, 1877: EF 640162.1, EU 358912.1, GU 457838.1, EU 019867,72,77.1; *A. helianthi* Monell, 1879: JQ 860278-79.1; *A. oenotherae* Oestlund, 1887: EU 358922.1, DQ 418860-62,71-74.1; *A. praeterita* Walker, 1849: DQ 418866-67.1; *A. spiraecola* Patch, 1914: EU 358925.1, AY 219725.1; *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758): AY 219734.1, EU 358928.1; *Cinara edulis* (Wilson, 1919): AY 472023-24.1; *C. terminalis* (Gillette and Palmer, 1924): AY 472034-35.1; *Dysaphis pyri* (Boyer de Fonscolombe, 1841): JQ 437460,63-64,66,70.1; *D. reaumuri* (Mordvilko, 1928): JQ 437473-74.1; *Hormaphis similibetulae* Qiao and Zhang, 2004: DQ 493849,66.1; *Hyalopterus pruni* (Geoffroy, 1762): EU 358930.1, DQ 005160.1; *Kaburagia rhusicola* Takagi, 1937: EU 363672,75,77.1; *Lachnus tropicalis* (van der Goot, 1916): AF 163879.1, DQ 493846.1; *Megoura lespedezae* (Essing and Kuwana, 1918): HM 117789.1, EU 071357.1; *M. crassicauda* Mord-

vilko, 1919: EJ 982427.1, EU 071349-51.1; *Mollitrichosiphum rhusae* Ghosh, 1974: JX 255394-95.1; *Myzus persicae* (Sulzer, 1776): EF 419312, 14-15.1, EU 358933.1, JQ 808484.1; *Protrama ranunculi* (Del Guercio, 1909): AF 147816-17.1; *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758): AY 219719.1, EU 358936.1; *Rh. maidis* (Fitch, 1856): AY 219718.1, EU 358934.1, JQ 860288.1; *Schizaphis graminum* Rondani (1847), 1852: AY 219720.1, JF 968544-48, 50-51, 53-55.1; *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775): HM 117790.1, DQ 005155.1). Последовательности были получены из международной базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank NCBI [5].

Анализируемые участки гена включали частично второй, третий и частично четвертый экзоны, а также лежащие между ними интроны. Контроль идентичности диапазона анализируемого участка гена осуществили выравниванием используемых частичных сиквенсов с полноразмерной последовательностью мРНК EF1a *A. pisum* [XM 001948705.2]. Все сравнения проводили только между последовательностями одного и того же вида тлей, поскольку установление уровня межвидовых различий было проведено нами ранее [4]. Выравнивание последовательностей, расчет генетических дистанций и процентного содержания вариабельных сайтов провели в программе MEGA 6. Для множественного выравнивания последовательностей применяли алгоритм Muscle с назначенным штрафом за вставку пробелов – 400.

Генетические дистанции рассчитывали по методу максимального подобия составных последовательностей (MCL) отдельно для ортологичных экзонов и интронов. При расчете генетических дистанций между экзонами учитывали все три позиции в кодоне, интроны анализировали как некодирующие последовательности. Расчет процентного содержания вариабельных сайтов в нуклеотидных последовательностях также проводили отдельно для экзонов и интронов, учитывая, что скорость нуклеотидных замещений может различаться в белок-кодирующих и некодирующих областях одного и того же гена. При этом для экзонов отдельно рассчитывали процентное содержание несинонимичных замен как процентную долю сайтов, содержащих несинонимичные нуклеотидные замены, от общего числа однонуклеотидных сайтов в анализируемом участке гена.

Аминокислотные последовательности получали транслированием нуклеотидной последовательности (таблица кодирования № 5) и анализировали в программе BioEdit.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ последовательностей гена EF1a, принадлежащих одному виду тлей, показал, что существует внутривидовая вариабельность последовательностей в виде одной или нескольких однонуклеотидных замен, которые могут быть локализованы как в экзонах, так и в интронах гена. При расчете внутривидовых генетических дистанций оказалось, что значения парных генетических дистанций, рассчитанные по белок-кодирующим областям гена (CDS), различаются у разных видов тлей. Наиболее высокое значение генетической дистанции было отмечено у *S. avenae* и составляло 0,041 (табл. 1). Низкое значение генетических дистанций, не превышавшее 0,001, показали несколько видов, а именно *A. fabae*, *B. brassicae*, *H. similibetulae*, *M. rhusae*, *P. ranunculi*, *Rh. maidis*.

Таблица 1

Средние значения парных внутривидовых генетических дистанций между последовательностями EF1a тлей, рассчитанные для разных участков гена

Семейство	Вид	N*	CDS**	Инtron 2	Инtron 3
Aphididae	<i>A. pisum</i>	2	0,013	0	0
	<i>A. craccivora</i>	3	0,003	0	0,010
	<i>A. epilobiaria</i>	2	0,016	0,046	0,154
	<i>A. fabae</i>	4	0,001	0	0
	<i>A. farinosa</i>	2	0,005	0,030	0,014
	<i>A. gossypii</i>	6	0,002	0,022	0,017
	<i>A. helianthi</i>	2	0,003	0	0
	<i>A. oenotherae</i>	8	0,004	0,010	0
	<i>A. praeterita</i>	2	0,003	0	0
	<i>A. spiraeicola</i>	2	0,004	0	0
	<i>B. brassicae</i>	2	0,001	0,014	0
	<i>D. pyri</i>	5	0,004	0	0,018
	<i>D. reaumuri</i>	2	0,021	0	0

Семейство	Вид	N*	CDS**	Инtron 2	Инtron 3
Aphididae	<i>H. pruni</i>	2	0,003	0,081	0,092
	<i>M. lespedezae</i>	2	0,003	0	0
	<i>M. crassicauda</i>	4	0,004	0	0
	<i>M. persicae</i>	5	0,004	0,011	0,009
	<i>Rh. padi</i>	2	0,001	0	0
	<i>Rh. maidis</i>	3	0,002	0	0
	<i>Sch. graminum</i>	11	0,002	0	0,008
	<i>S. avenae</i>	2	0,041	0,038	0,074
Greenideidae	<i>M. rhusae</i>	2	0,001	0	0,018
Hormaphididae	<i>H. similibetulae</i>	2	0,001	0	0
Lachnidae	<i>C. edulis</i>	2	0,003	0	0
	<i>C. terminalis</i>	2	0,004	0	0,096
	<i>L. tropicalis</i>	2	0,005	0	0
	<i>P. ranunculi</i>	2	0,001	0	0
Pemphigidae	<i>K. rhusicola</i>	3	0,009	0,020	0,007

* Количество последовательностей, использованных в анализе, для каждого вида тлей. ** Белок-кодирующая область гена.

В целом у всех видов тлей значения внутривидовых генетических дистанций, рассчитанных по экзонам, были невысокими и различались несущественно. Не удалось обнаружить связь значения генетических дистанций между белок-кодирующими областями с принадлежностью видов к конкретному семейству или роду. Также не наблюдалось зависимости значения генетической дистанции от числа анализируемых последовательностей. Действительно, у *Sch. graminum* было проанализировано 11 последовательностей и средние значения генетических дистанций для белок-кодирующей области, 2 и 3 интронов составили 0,002, 0,0 и 0,008 соответственно. В то же время у *S. avenae* было проанализировано только 2 последовательности, а значения генетических дистанций для аналогичных областей гена составили 0,041, 0,038, 0,074.

При сравнении внутривидовых генетических дистанций, рассчитанных отдельно по последовательностям интронов, ситуация оказалась иной. Наиболее высокое значение средней генетической дистанции и во втором, и в третьем интронах было отмечено у *A. epilobiaria* и составляло 0,046 и 0,154 соответственно. Следует отметить, что значение средней генетической дистанции по белок-кодирующей области у этого вида было также высоким и превышало значения, рассчитанные для других видов рода *Aphis*, на порядок.

Тем не менее не все виды тлей демонстрировали рост генетических дистанций при анализе некодирующих участков гена в сравнении с кодирующими, как этого можно было ожидать. Значения генетических дистанций были равны нулю во втором интроне у 19 видов, а в третьем интроне – у 16 видов из 28. Ясной зависимости величины значения генетической дистанции от того, для какого интрона она была рассчитана, обнаружено не было. У разных видов тлей значения генетических дистанций, рассчитанных для отдельных интронов, существенно различались. В частности, у *A. farinosa* внутривидовое значение генетической дистанции по второму интрону было почти в два раза больше значения дистанции, рассчитанного по третьему интрону. Обратная ситуация наблюдалась у *A. epilobiaria* и *S. avenae*.

В результате прямого анализа нуклеотидного состава белок-кодирующей области гена EF1a было обнаружено, что количество варибельных сайтов в исследуемых последовательностях сильно разнятся (табл. 2).

Таблица 2

Доля варибельных сайтов в разных участках нуклеотидной последовательности гена EF1a внутри видов тлей, %

Семейство	Вид	CDS*	Из них несинонимичных	Инtron 2	Инtron 3
Aphididae	<i>A. pisum</i>	1,3	0,3	0	0
	<i>A. craccivora</i>	0,4	0,1	0	1,4
	<i>A. epilobiaria</i>	1,6	0,4	4,3	11,8
	<i>A. fabae</i>	0,4	0,1	0	0

Семейство	Вид	CDS*	Из них несинонимичных	Интрон 2	Интрон 3
	<i>A. farinosa</i>	0,5	0	2,9	1,4
	<i>A. gossypii</i>	0,5	0,1	4,5	2,9
	<i>A. helianthi</i>	0,3	0	0	0
	<i>A. oenotherae</i>	0,4	0	2,9	0
	<i>A. praeterita</i>	0,3	0,3	0	0
	<i>A. spiraeicola</i>	0,4	0,1	0	0
	<i>B. brassicae</i>	0,1	0,1	1,4	0
	<i>D. pyri</i>	0,4	0,4	0	4,2
	<i>D. reaumuri</i>	2,1	1,3	0	0
	<i>H. pruni</i>	0,3	0	7,2	8,3
	<i>M. lespedezae</i>	0,3	0,3	0	0
	<i>M. crassicauda</i>	0,4	0	0	0
	<i>M. persicae</i>	1,0	1,0	1,6	1,4
	<i>Rh. padi</i>	0,1	0	0	0
	<i>Rh. maidis</i>	0,3	0	0	0
	<i>Sch. graminum</i>	0,4	0	0	2,8
	<i>S. avenae</i>	4	0,5	3,6	4,5
Greenideidae	<i>M. rhusae</i>	0,1	0	0	1,7
Hormaphididae	<i>H. similibetulae</i>	0,1	0,1	0	0
Lachnidae	<i>C. edulis</i>	0,3	0	0	0
	<i>C. terminalis</i>	0,4	0	0	7,6
	<i>L. tropicalis</i>	0,5	0,2	0	0
	<i>P. ranunculi</i>	0,1	0	0	0
Pemphigidae	<i>K. rhusicola</i>	1,4	0,3	2,9	1,1

* Белок-кодирующая область гена.

У видов *A. pisum*, *A. epilobiaria*, *D. reaumuri*, *K. rhusicola*, *M. persicae* и *S. avenae* процентное содержание варибельных сайтов в белок-кодирующей области гена превышает 1 %, что близко к уровню межвидовых различий. Наибольшее значение данного показателя характерно для *S. avenae* и составило 4 %. Количество несинонимичных замен было равно нулю у 12 видов из 28. Однако некоторые виды показали высокую долю несинонимичных замен, что не типично для внутривидовых последовательностей. В частности, у *A. praeterita*, *B. brassicae*, *D. pyri*, *M. lespedezae*, *M. persicae* и *H. similibetulae* все выявленные замены были несинонимичными. В то же время некоторые из этих видов при наличии несинонимичных замен в экзонах не имели замен в интронах, являющихся значительно более варибельными в соответствии с классическими представлениями молекулярной генетики. У *A. pisum*, *A. fabae*, *A. spiraeicola*, *D. reaumuri* и *L. tropicalis* также были обнаружены несинонимичные замены в экзонах при отсутствии замен в интронах, хотя и в меньшем количестве. Следует заметить, что преобладание количества несинонимичных замен над количеством синонимичных в белок-кодирующих последовательностях обычно трактуется как признак существования движущего отбора по продукту исследуемого гена [6]. Однако в нашем случае, когда речь идет о чрезвычайно древнем гене, так называемом гене домашнего хозяйства, такое объяснение кажется маловероятным. Тем не менее существование указанной особенности не вызывает сомнения, хотя и не представляется простым для объяснения.

Оценка общего уровня сходства нуклеотидных последовательностей показала, что белок-кодирующие области гена каждого вида тлей были сходны между собой не менее чем на 96 %. Интроны также обладали чрезвычайно высоким сходством нуклеотидных последовательностей. Вторые интроны каждого вида тлей были сходны на 92,8 %, третьи интроны – на 88,2 %. Более чем у половины исследуемых видов второй и третий интроны были полностью идентичны. Зависимости полученных значений от числа анализируемых последовательностей установлено не было.

В ходе изучения аминокислотных замен на данном участке гена было обнаружено, что самое значительное их количество характерно для *M. persicae* (табл. 3), т. е. больше, чем по одной аминокислотной замене на каждую из анализируемых последовательностей.

Внутривидовые аминокислотные замены в анализируемой области аминокислотной последовательности EF1a тлей

Вид	Количество замен	Замены	Место локализации в полипептидной цепи
<i>A. pisum</i>	2	K↔N A↔P	273 338
<i>A. craccivora</i>	1	V↔I	216
<i>A. epilobiaria</i>	1	S↔T	209
<i>A. fabae</i>	1	R↔H	297
<i>A. gossypii</i>	1	H↔Y	254
<i>A. praeterita</i>	1	G↔R	225
<i>A. spiraeicola</i>	1	T↔I	104
<i>B. brassicae</i>	1	T↔I	178
<i>D. pyri</i>	1	G↔S	229
<i>D. reaumuri</i>	3	W↔C P↔S A↔V	210 227 245
<i>H. similibetulae</i>	1	G↔C	70
<i>K. rhusicola</i>	2	V↔F K↔E	98 169
<i>L. tropicalis</i>	1	E↔K	62
<i>M. lespedezae</i>	2	A↔V V↔L	113 144
<i>M. persicae</i>	8	T↔I E↔K G↔C A↔V V↔E A↔V R↔H T↔K	90 154 258 283 288 292 295 335
<i>S. avenae</i>	3	W↔T A↔N C↔N	165 215 303

В то же время у *Sch. graminum* не было обнаружено ни одной аминокислотной замены, несмотря на наибольшее число сравниваемых последовательностей.

Оценивая пространственный рисунок замен на протяжении аминокислотной цепочки, мы не обнаружили какой-либо их пространственной приуроченности. Замены располагались равномерно по всему протяжении анализируемого участка белка, строго консервативных участков в аминокислотной последовательности обнаружено не было.

На основании приведенных выше данных можно заключить, что ген EF1a тлей характеризуется достаточно низкой внутривидовой вариабельностью для того, чтобы этот ген мог быть рекомендован как молекулярно-генетический маркер видовой диагностики. Внутривидовые генетические дистанции по отдельным участкам гена существенно не различаются. В целом генетические дистанции между последовательностями интронов соизмеримы или меньше генетических дистанций, рассчитанных для экзонов тех же последовательностей. Нуклеотидные последовательности отдельных участков гена обладают высоким, иногда 100 % сходством. В то же время наличие внутривидовой вариабельности, обеспеченное нуклеотидными заменами, локализованными в экзонах, с одновременной низкой изменчивостью интронов, делает этот ген потенциально применимым для диагностики не только видов, но и внутривидовых форм.

Работа выполнена при поддержке гранта № Б13-062 БРФФИ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Стекольников А. В., Лобанов А. Л. Использование нетрадиционных методов для диагностики тлей (Homoptera, Aphidoidea) // Энтомологическое обозрение. 1990. Т. 69, № 2. С. 357–373.
2. Lozier J. D., Footitt R. G., Miller G. L., Mills N. G., Roderick G. K. Molecular and morphological evaluation of the aphid genus *Hyalopterus* Koch (Insecta: Hemiptera: Aphididae) with a description of a new species // Zootaxa. 2008. Iss. 1688. P. 1–19.

3. Rand D. M. The units of selection on mitochondrial DNA // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2001. Vol. 32. P. 415–448.
4. Воронова Н. В., Головенчик В. И., Буга С. В., Курченко В. П. Вариабельность структуры и нуклеотидного состава гена EF1a у тлей (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphidoidea) // *Труды БГУ.* 2013. Т. 8 : в 2 ч. Ч. 1. С. 183–192.
5. Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Clark K., Lipman D. J., Ostell J., Sayers E. W. GenBank [Electronic resource] // *Nucleic Acids Research.* 2008. Vol. 36. URL: http://nar.oxfordjournals.org/content/36/suppl_1/D25.full (date of access: 14.08.2014).
6. Лукашов В. В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М., 2009.

Поступила в редакцию 02.09.2014.

Виктория Ивановна Головенчик – студентка 4-го курса биологического факультета.

Нина Владимировна Воронова – кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии.

Сергей Владимирович Буга – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии.

УДК 581.01

Д. Е. СТРЕЛЬЦОВА, Д. В. КОЛБАНОВ, Е. О. ЛЕГЕРОВА, И. И. ДОНСКАЯ, В. Н. ЖАБИНСКИЙ, П. В. ЧИКУН,
А. В. БАТУЛЕВ, С. А. ЧАЙКУН, А. И. СОКОЛИК, В. В. ДЕМИДЧИК

ЭПИКАСТАСТЕРОН АКТИВИРУЕТ КАЛЬЦИЙ-ПРОНИЦАЕМЫЕ КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ И СТИМУЛИРУЕТ РОСТ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Изучены закономерности воздействия 24-эпикастастерона (предшественника брассинолида) на входящие трансмембранные токи ионов кальция, контролирующие рост растительной клетки, а также выявлено влияние данного вещества на образование корневой системы у высших растений. Данные реакции не были изучены ранее, они имеют большое значение для создания новых средств укоренения и повышения жизнеспособности посадочного материала. С использованием методики пэтч-кламп показано, что экзогенный 24-эпикастастерон активирует внутрь проводящие Ca^{2+} -проницаемые катионные каналы плазматической мембраны клеток корня пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Эпикастастерон-индуцируемая проводимость ингибировалась ионами гадолиния, обладала быстрой кинетикой активации и слабым выпрямлением при гиперполяризации, что типично для Ca^{2+} -проницаемых неселективных катионных каналов клеток корня высших растений. В ходе 300-дневного вегетационного эксперимента продемонстрировано, что обработка 24-эпикастастероном в 3 раза повышает вероятность формирования корневой системы у эксплантов плохуюкореняемого сорта туи западной (*Thuja occidentalis* L. Smagard). Полученные данные указывают на то, что 24-эпикастастерон способен активировать вход Ca^{2+} в клетки корня и обладает стимулирующим воздействием на формирование корней у высших растений.

Ключевые слова: брассиностероиды; эпикастастерон; ионные каналы; клеточная сигнализация; плазматическая мембрана; рост и развитие растений.

The effect of 24-epicastasterone on inwardly-directed transmembrane currents of Ca^{2+} and the formation of root system in higher plants has been determined. These reactions haven't been previously studied and have a great potential for practical use, for example they can be used for development of new plant growth stimulators and protectants. Experiments with patch-clamp technique showed that exogenous 24-epicastasterone activated inwardly-directed Ca^{2+} -permeable cation channels of wheat root plasma membrane (*Triticum aestivum* L.). It showed sensitivity to gadolinium ions, fast activation kinetics and slow rectification on hyperpolarization (typical for Ca^{2+} -permeable nonselective cation channels in plasma membranes of higher plants). Results of 300-day-long rooting test demonstrated that 24-epicastasterone increased the probability of root formation in shoot explants of *Thuja occidentalis* L. Smagard by about three times. Overall, the obtained data indicate that 24-epicastasterone can activate Ca^{2+} -influx system, which is probably responsible for stimulation of root growth and development.

Key words: brassinosteroids; epicastasterone; ion channels; cell signalling; plasma membrane; plant growth and development.

Брассиностероиды – группа гормонов растений стероидной природы, обладающих различными физиологическими функциями. Они регулируют рост пыльцевых трубок и корней, метаболизм этилена и ауксина, функционирование H^+ -АТФаз, дифференцировку ксилемы, экспрессию генов иммунитета и другие процессы в организме растения [1, 2]. Важнейшим с практической точки зрения эффектом брассиностероидов является усиление стрессоустойчивости. На основе этих фитогормонов, в частности брассинолида, 24-эпибрасинолида, 28-гомобрасинолида и 28-норбрасинолида, созданы препараты, повышающие иммунитет растений и способствующие их более высокой продуктивности [3]. В то же время другим эффектом брассиностероидов, имеющим потенциально высокое прикладное значение, является регуляция роста и развития растений. Расшифрованный в последние годы молекулярный механизм синергизма брассиностероидов и ауксинов [2] предполагает, что брассиностероиды потенциально могут стимулировать рост корней и формирование корневой системы.

В последние годы расшифровано содержание ранних стадий взаимодействия брассиностероидов с клетками высших растений [2]. В частности, продемонстрировано, что брассиностероиды способны запускать процессы клеточной сигнализации посредством воздействия на специализированный рецептор BRI1 на плазматической мембране [4, 5]. В результате в цитоплазме запускается каскад